·论著·

干扰素-γ 酶联免疫斑点检测在识别抗结核药物超敏反应患者致敏药物中的价值

吴于青*，刘伯，廖永美

330006，江西省南昌市东湖区叠山路346号，江西省胸科医院感染性疾病科
通信作者：吴于青，主任医师；E-mail：qingxiaoxi1980@163.com

【摘要】 背景 抗结核药物超敏反应在临床上很常见，药物激发试验是目前唯一有效的找出致敏药物的方法，但可诱发患者再次出现过敏甚至休克，严重时危及患者生命；也有患者放弃治疗导致结核菌耐药和播散。由于目前常用的抗结核方案需要四种药物联合使用，如何及时、精确的找出诱导患者出现过敏反应的致敏药物是临床迫切需要解决的问题。目的 评估IFN-γ 酶联免疫斑点法在快速识别出诱导此类患者发生超敏反应的致敏药物中的临床价值。方法 选取2021年1月—2022年12月在我院住院治疗的初治敏感肺结核且在治疗过程中发生药物超敏反应的患者50例，采集患者过敏急性期外周血单个核细胞，用酶联免疫斑点法检测药物特异性IFN-γ 释放细胞的情况，采用药物激发试验作为判定何种药物诱导的超敏反应的金标准；分析酶联免疫斑点检测对识别抗结核四联方案（异烟肼、乙胺丁醇、利福平、吡嗪酰胺）所致超敏反应中的临床价值。结果 酶联免疫斑点法在识别异烟肼、乙胺丁醇、利福平、吡嗪酰胺所致超敏反应中的灵敏度分别为69.2%、61.5%、75.0%、66.7%，特异性为97.3%、100.0%、100.0%、100.0%。结论 IFN-γ 酶联免疫斑点检测在抗结核药物过敏患者急性期需进行致敏药物识别时，可作为一种体外检测的有效手段。

【关键词】 结核；抗结核药；超敏反应；酶联免疫斑点法；干扰素-γ
【中图分类号】 R 52　R 978.3　【文献标识码】 A　DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0573

The Value of Enzyme-linked Immunospot Assay in Identifying Causative Agents in Patients with Hypersensitivity Reactions to Antitubercular Agents

WU Yuqing[*]，*LIU Zhou*，*LIAO Yongmei*
Infectious diseases Department，Jiangxi Chest Hospital，Nanchang，330006，China
[*]Corresponding author：WU Yuqing，chief physician；E-mail：qingxiaoxi1980@163.com

【Abstract】 **Background** Hypersensitivity reactions of antitubercular agents are very common in clinical practice. Drug provocation test is the only effective method to find out the causative agents，but it may cause re-sensitization or even shock，which can be life-threatening in severe cases； there are also patients who abandon treatment leading to drug resistance and dissemination of TB bacteria. Due to the fact that the conventional anti-tuberculosis treatment regimen involves the combination of four drugs，it is an urgent challenge for clinicians to quickly，safely，and accurately identify causative agents. **Objective** To evaluate the clinical application value of enzyme-linked immunospot assay in identifying causative agents in patients with hypersensitivity reactions to antitubercular agents. **Methods** A total of 50 patients with hypersensitivity reactions during the treatment of primary pulmonary tuberculosis hospitalized in Jiangxi Chest Hospital from January 2021 to December 2022 were selected. Mononuclear cells of peripheral blood were collected from patients in the acute phase of allergy，drug specific IFN-γ releasing cells was detected by enzyme-linked immunospot assay，and the drug provocation test（DPT）was used as the gold standard for determining which drug causes hypersensitivity reactions； the clinical value of the enzyme-linked immunospot assay in identifying hypersensitivity reactions caused by the antituberculosis quadruple regimen（isoniazid，ethambutol，

基金项目：国家自然科学基金地区科学基金资助项目（81960003）
引用本文：吴于青，刘伯，廖永美. 干扰素-γ 酶联免疫斑点检测在识别抗结核药物超敏反应患者致敏药物中的价值[J]. 中国全科医学，2024.［Epub ahead of print］. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0573.［www.chinagp.net］
WU Y Q，LIU Z，LIAO Y M. The value of enzyme-linked immunospot assay in identifying causative agents in patients with hypersensitivity reactions to antitubercular agents［J］. Chinese General Practice，2024.［Epub ahead of print］.



rifampicin，pyrazinamide）. **Results** The sensitivity of the enzyme-linked immunospot assay in recognizing hypersensitivity reactions due to isoniazid，ethambutol，rifampicin，and pyrazinamide was 69.2%，61.5%，75.0%，and 66.7%，and the specificity was 97.3%，100.0%，100.0%，and 100.0%，respectively. **Conclusion** Enzyme linked immunospot assay can be used as an effective method for in vitro detection when causative agents identification is required in patients with hypersensitivity reactions to antitubercular agents at the acute stage.

【Key words】 Tuberculosis；Antitubercular agents；Hypersensitivity；Enzyme linked immunospot assay；INF-γ

超敏反应是结核科临床医生在患者治疗中经常需要面临的不良反应之一[1-2]，结核病患者在四种药物联合使用过程中，发生超敏反应后如何及时准确识别出致敏药物是一种挑战，尤其是对于病情危重的患者[3-4]。尽管包括皮肤斑贴实验（SPT）、嗜碱性粒细胞活化试验（BAT）和药物淋巴细胞激发试验（DLST）等数种体外检测方法已被临床用于药物超敏反应的诊断和致敏药物的识别[5-7]，但由于这些检测的灵敏度太低，使得医生不得不使用药物激发试验（DPT）来识别出导致过敏的药物[8]，而让患者再次处于发生过敏反应的危险之中。抗结核药物超敏反应主要是由抗原特异性T细胞介导，多种细胞因子参与。药物特异性的T细胞在药物刺激后引发钙离子内流和转录因子表达增加，随后，细胞活化进入功能分化期，产生炎症因子引起一系列的炎症反应。酶联免疫斑点法（ELISpot）检测炎性细胞因子如干扰素-γ（IFN-γ）、白介素-2（IL-2）等最近被用于识别诱导药物超敏反应的致敏药物，已成为国际研究的热点。ELISpot是单细胞水平检测，有可能在成千上万的外周血单个核细胞（PBMCs）中识别一个药物特异性的T细胞[9]，目前用于评价β-内酰胺类（BLs）抗菌药物抗惊厥药物超敏反应的研究较多，灵敏度从13%~91%不等[10-11]。而对于ELISpot检测法在识别抗结核药物诱导超敏反应中的致敏药物方面，目前国内外尚没有这方面的研究。本研究拟进一步验证酶联免疫斑点法在识别抗结核药物超敏反应致敏药物中的敏感性和特异性；将为抗结核药物超敏反应致敏药物识别的体外检测方法开阔新的思路和提供临床依据；以期在短时间内安全、快速、有效地找出致敏药物，让患者尽快能够继续规则的抗结核治疗，减轻患者家庭和社会的负担，减少结核病播散和耐药。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

选取2021年1月—2022年12月在江西省胸科医院感染性疾病科住院，诊断符合初治敏感肺结核，并且在抗结核治疗过程中发生超敏反应的患者50例为研究对象。纳入标准：（1）符合《肺结核诊断和治疗指南》[4]中初治敏感肺结核的诊断。（2）临床特征和实验检测结果符合《中国临床皮肤病学》第2版[16]药物超敏反应的定义。排除标准：（1）同时存在人获得性免疫缺陷病毒感染；（2）同时存在慢性肾病、糖尿病、血液病、自身免疫性疾病，或患者在使用相关治疗药物。本研究已通过江西省胸科医院伦理委员会审批（伦理审批号：赣胸伦审字（2019）2号），所有研究对象已签署知情同意书。研究对象的年龄为16~80岁，平均年龄（44.6±19.5）岁。

1.2 研究方法

1.2.1 抗结核药物超敏反应患者PBMCs分离：本研究中使用的试剂均来自于天津灏洋华科生物科技有限公司。将采集的抗凝血按相等比例与RPMI 1640培养液均匀混合，按2：1配比把稀释后的血标本缓慢加到Ficoll淋巴细胞分离液上，在18℃条件下，调整为1 000 g，使用离心机离心22 min，再将分离出来的PBMCs取出至另一个15 mL尖底离心管内，加入Roswell Park Memorial Institute 1640培养液到10 mL，调整温度为18℃，600 g，予离心7 min，进行第1次洗涤，离心后去除上清，加入1mL Roswell Park Memorial Institute 1640培养液将细胞轻缓重新悬浮，然后加Roswell Park Memorial Institute 1640到10mL，18℃，350 g，离心7 min，进行第2次洗涤，离心后小心弃去上清液，加入500 μL的AIM-V（根据细胞数量调整加入量），轻缓重悬细胞，取10 μL重悬的细胞液，用0.4%的台酚蓝染液40 mL，调制成1：5的细胞稀释液，混匀后取10 μL加入细胞计数板，进行活细胞计数，调整细胞浓度至2.5×10^6/mL备检。

1.2.2 ELISpot检测：分别在包被有小鼠抗人的IFN-γ单抗的96孔培养板上，每六孔为一组，分为四组，按空白对照孔、异烟肼孔、利福平孔、吡嗪酰胺孔、乙胺丁醇孔、阳性对照孔顺序排列并做标记；阴性对照孔加入50 μL RPMI 1640培养液+50 μL IL-2（50 IU/mL），50 μL预先制备的药物及50 μL IL-2分别加入相应的药物抗原孔，阳性对照孔加入10 μg/mL的植物血凝素（phytohemagglutinin，PHA）100 μL，并在各反应孔添加100 μL细胞分离液。把培养板放入培养箱孵育24 h后，再取出培养板，弃去上层培养液，然后每孔加入200 μL无菌磷酸缓冲盐溶液，重复洗涤3遍以上。用磷酸缓冲盐溶液200倍稀释浓缩标记抗体试剂制成标记抗体，在每孔加入50 μL，在培养箱2e~8℃孵

育 60 min，后弃去标记抗体，洗板显色 - 无菌 PBS 洗涤 4 遍除去未结合的酶标抗体，每孔加入 50 uL TMB 显色液，室温条件下孵育 8 min。用蒸馏水反复洗涤培养板后，在 37℃温箱内使培养板干燥，计数并记录每孔内深蓝色清晰的斑点数。

1.2.3 判断诱导超敏反应的药物：采集好患者基线数据后，予以抗过敏及对症治疗，症状缓解后在医生密切观察下进行 DPT，逐步试用 4 种可疑药物（根据具体情况决定试药顺序），从小剂量开始逐渐加量，每种药物试用时间为 3 ~ 4 d，如出现符合超敏反应诊断的情况，即判定为 DPT 阳性，此药即为致敏药物。

1.3 统计学分析

采用四格表法计算酶联免疫斑点法对异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、乙胺丁醇所致超敏反应的诊断价值，其中灵敏度 = 真阳性数 /（真阳性数 + 假阴性数）×100%，特异度 = 真阴性数 /（真阴性数 + 假阳性数）×100%。

2 结果

DPT 共检出 63 例次抗结核药物所致超敏反应的致敏药物。酶联免疫斑点法共检出 11 例次两种抗结核药物所致超敏反应，1 例次三种抗结核药物所致超敏反应。酶联免疫斑点法诊断异烟肼、乙胺丁醇、利福平、吡嗪酰胺所致超敏反应的灵敏度分别为 69.2%、61.5%、75.0%、66.7%，特异度为 97.3%、100.0%、100.0%、100.0%（表 1~4）。

表 1 酶联免疫斑点法对异烟肼所致超敏反应的诊断价值（n=50，例）
Table 1 The diagnostic value of enzyme-linked immunosorbent assay for isoniazid induced hypersensitivity reactions

酶联免疫斑点法	DPT		合计
	阳性	阴性	
阳性	9	1	10
阴性	4	36	40
合计	13	37	50

注：DPT= 药物激发试验。

表 2 酶联免疫斑点法对利福平所致超敏反应的诊断价值（n=50，例）
Table 2 The diagnostic value of enzyme-linked immunosorbent assay for hypersensitivity reactions caused by rifampicin

酶联免疫斑点法	DPT		合计
	阳性	阴性	
阳性	15	0	15
阴性	5	30	35
合计	20	30	50

表 3 酶联免疫斑点法对吡嗪酰胺所致超敏反应的诊断价值（n=50，例）
Table 3 The diagnostic value of enzyme-linked immunosorbent assay for hypersensitivity reactions caused by pyrazinamide

酶联免疫斑点法	DPT		合计
	阳性	阴性	
阳性	10	0	10
阴性	5	35	40
合计	15	35	50

表 4 酶联免疫斑点法对乙胺丁醇所致超敏反应的诊断价值（n=50，例）
Table 4 The diagnostic value of enzyme-linked immunospot assay for hypersensitivity reactions caused by ethambutol

酶联免疫斑点法	DPT		合计
	阳性	阴性	
阳性	8	0	8
阴性	5	37	42
合计	13	37	50

3 讨论

对于医生和患者来说，在抗结核治疗过程中明确引起超敏反应的致敏药物是一个重要的挑战，因为这影响到患者后续的治疗。目前认为，抗结核药物超敏反应以迟发型超敏反应为主，通常是在摄入抗结核药物后数小时甚至数天后发生，由 T 淋巴细胞介导的免疫反应导致，多种细胞因子参与。T 淋巴细胞的活化在药物刺激后几分钟内开始，引发钙离子内流和细胞因子如干扰素（IFN）-γ 等表达增加。但实际上药物特异性 T 细胞在整个 PBMCs 是极其罕见的，频率约为 1/ 数万的 PBMCs12-13］。本研究组曾用药物淋巴细胞刺激试验（DLST）体外检测致敏药物，但可能产生假阴性结果，因为即使存在药物特异性 T 细胞，DLST 中的 T 细胞活力并不总是足以检测到孵育后的细胞分裂。然而，IFN-γ ELISpot 试验有可能在成千上万的 PBMCs 中识别单个药物特异性 T 细胞。

与本项目类似的研究报告表明青霉素诱导的传统 IFN-γ ELISpot 检测比 DLST 更敏感[14-15]。本研究结果表明，在药物诱导的 T 细胞反应强到足以引起细胞分裂的情况下，ELISpot 能够检测到药物诱导的 IFN-γ 产生。本研究入组的大多数病例均在药物过敏急性期采血，同时在药物和 PBMCs 孵育过程中加入 IL-2 来稳定特异性 T 细胞活化后 IFN-γ 的分泌，所以本研究使用这种改良的 IFN-γ ELISpot 法在超过 60% 的病例中检测到药物特异性 T 细胞，不管患者是哪一类型的皮肤过敏反应。本研究发现，对于同时对多种结核药过敏的患者，ELISpot 法检测的灵敏度更高，50 例患者中，DPT 检测发现有 11 例患者对 2 种抗结核药物过敏，1 例患者对三种抗结核药物，而这些患者 IFN-γ ELISpot 法检测均为阳性。

对于使用改进的 IFN-γ ELISpot 方法即加入 IL-2 刺激 PBMCs 是否会导致非特异性 IFN-γ 的产生而出现假阳性结果的问题，本研究发现，在没有药物的试验孔中，大多数情况下检测到生成的 IFN-γ 点不足 5 个。出现的这些 IFN-γ 斑点可能是非特异性的，在没有接触致敏药物的情况下被检测到，考虑原因为部分患者符合药物超敏反应综合征（DIHS）的诊断，出现长时间的皮疹，本研究推测非特异性斑点可能与 DIHS 相关的持续免疫异常有关。但是在临床中发现，有部分对多种抗结核药物过敏的患者，过敏急性期 IFN-γ ELISpot 法检测为阳性，皮疹消褪后 DPT 结果也是阳性，2~3 月后再次进行 DPT，却有部分原来阳性的药物转变成阴性了，考虑原因为在过敏急性期，机体过敏阈值下降有关。

无论在国内还是国外，药物超敏反应的体外检测方法已逐渐形成热点，但由于检测的敏感性太低，如何提高检测的敏感性已成为目前研究的焦点。本研究采用酶联免疫斑点检测法，并通过在实验过程中加入 T 细胞活性调节剂来稳定 IFN-γ 的分泌，大大提高了检测的敏感性。总体来说，本研究结果表明，IFN-γ ELISpot 检测方法可能是一种有用的体外工具，用于识别抗结核药物超敏反应病例中的致敏药物，将有助于抗结核药超敏反应患者快速安全找出致敏药物，及时调整抗结核治疗方案，增加患者治疗疾病的信心，对我国结核病防控目标的顺利实现有积极作用。

作者贡献：吴于青负责研究的构思、设计与实施，撰写论文；吴于青、刘佁进行数据收集整理、统计学处理、图表绘制；廖永美负责论文修订、文章质量控制。

本文无利益冲突。

吴于青：https://orcid.org/0000-0003-4801-894X

参考文献

[1] TRAORE B, TSOUMBOU BAKANA G, NANI S, et al. Risk management assessments of anti-tuberculosis adverse drug reaction: a systematic review [J]. E3S Web Conf, 2021, 319: 01042. DOI: 10.1051/e3sconf/202131901042.

[2] AHEMAD SHAIK R, JAFFER S, FATIMA S H. Study on prevalence of adverse drug reactions and drug-drug interactions and co-morbid conditions of patients suffering from tuberculosis [J]. Res J Pharm Technol, 2021: 3911-3915. DOI: 10.52711/0974-360x.2021.00679.

[3] JIN H J, KANG D Y, NAM Y H, et al. Severe cutaneous adverse reactions to anti-tuberculosis drugs in Korean patients [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2021, 13 (2): 245-255. DOI: 10.4168/aair.2021.13.2.245.

[4] ALLOUCHERY M, LOGEROT S, COTTIN J, et al. Antituberculosis drug-associated DRESS: a case series [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2018, 6 (4): 1373-1380. DOI: 10.1016/j.jaip.2017.11.021.

[5] WU Y Q, XIAO G M, ZONG P L, et al. Diagnosis of hypersensitivity induced by antituberculosis drugs [J]. J Healthc Eng, 2021, 2021: 1-5. DOI: 10.1155/2021/6455659.

[6] SUN Q, SHA W, GUI X W, et al. Drug-induced lymphocyte stimulation test in the prediction of drug-induced hypersensitivity to antituberculosis drugs[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2015, 82(2): 172-176. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.008.

[7] 吴于青，代亮，陈雪花，等. 药物淋巴细胞刺激试验诊断抗结核药物所致超敏反应的临床价值研究 [J]. 中国全科医学，2018，21 (27): 3339-3342. DOI: 10.3969/j.issn.1007-9572.2017.00.227.

[8] 中华预防医学会过敏病预防与控制专业委员会预防食物药物过敏学组. 药物激发试验专家共识 [J]. 中华预防医学杂志，2020，54 (10): 1060-1068. DOI: 10.3760/cma.j.cn112150-20200711-00997.

[9] POREBSKI G, PIOTROWICZ-WOJCIK K, SPIEWAK R. ELISpot assay as a diagnostic tool in drug hypersensitivity reactions [J]. J Immunol Methods, 2021, 495: 113062. DOI: 10.1016/j.jim.2021.113062.

[10] COPAESCU A, MOUHTOURIS E, VOGRIN S, et al. The role of in vivo and ex vivo diagnostic tools in severe delayed immune-mediated adverse antibiotic drug reactions [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2021, 9 (5): 2010-2015.e4. DOI: 10.1016/j.jaip.2020.12.052.

[11] COPAESCU A, GIBSON A, LI Y R, et al. An updated review of the diagnostic methods in delayed drug hypersensitivity [J]. Front Pharmacol, 2021, 11: 573573. DOI: 10.3389/fphar.2020.573573.

[12] COPAESCU A M, BEN-SHOSHAN M, TRUBIANO J A. Tools to improve the diagnosis and management of T-cell mediated adverse drug reactions [J]. Front Med, 2022, 9: 923991. DOI: 10.3389/fmed.2022.923991.

[13] SUTHUMCHAI N, SRINOULPRASERT Y, THANTIWORASIT P, et al. The measurement of drug-induced interferon γ-releasing cells and lymphocyte proliferation in severe cutaneous adverse reactions [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2018, 32 (6): 992-998. DOI: 10.1111/jdv.14890.

[14] POREBSKI G, PIOTROWICZ-WOJCIK K, SPIEWAK R. ELISpot assay as a diagnostic tool in drug hypersensitivity reactions [J]. J Immunol Methods, 2021, 495: 113062. DOI: 10.1016/j.jim.2021.113062.

[15] COPAESCU A, MOUHTOURIS E, VOGRIN S, et al. The role of in vivo and ex vivo diagnostic tools in severe delayed immune-mediated adverse antibiotic drug reactions [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2021, 9 (5): 2010-2015.e4. DOI: 10.1016/j.jaip.2020.12.052.

[16] 赵辨. 中国临床皮肤病学 [M]. 南京：江苏凤凰科学技术出版社，2017.

（收稿日期：2023-06-25；修回日期：2023-12-27）

（本文编辑：王世越）